Plant Pathology Bulletin 21: 53-64, 2012

開發檢疫菌 *Phytophthora ramorum* 之 PCR 快速檢測技術

彭可均 [1]、安寶貞 [2]、林筑蘋 [1]、江迪蔚 [1]、劉瑞芬 [1, 3]

[1] 國立臺灣大學植物病理與微生物學系，臺北市，106，臺灣
[2] 臺灣農業試驗所，臺中市霧峰，403，臺灣
[3] 連絡作者電子郵件: rfliou@ntu.edu.tw，傳真：+886-2-23620271
接受日期: 中華民國 101 年 4 月 5 日

摘 要

彭可均、安寶貞、林筑蘋、江迪蔚、劉瑞芬. 2012. 開發檢疫菌 *Phytophthora ramorum* 之 PCR 快速檢測技術. 植病會刊 21: 53-64.

Phytophthora ramorum Werres, de Cock & Man in't Veld, sp. Nov. 是引發櫟樹猝死病(sudden oak death; SOD)之病原菌，但除了櫟樹外，尚可感染杜鵑及珊瑚樹(莢迷)等多種林木，是國際間備受矚目的重要病原菌。*P. ramorum* 肆虐之區域主要分佈於美國及歐洲多個國家如荷蘭、比利時、英國及德國等，目前並未在台灣出現。由於該菌致病性強，且寄主多為重要林木及灌木，若不幸入侵，將嚴重影響生態、景觀與種苗產業，因此 *P. ramorum* 已被我國列為重要檢疫病原菌。為開發此病原菌之快速檢測技術，本研究根據 YPT 基因及核醣體 RNA 基因之序列分別設計 *P. ramorum* 專一性及疫病菌廣效性引子對；PCR 分析結果顯示，其具備良好專一性，可偵測之最低量 *P. ramorum* DNA 分別為 1 ng 及 10 pg。為檢測病原菌在輸入樣品的存在情形，我們進一步建立以杜鵑葉片誘釣疫病菌，並進行 multiplex PCR 的實驗流程，可提供檢疫單位使用，以快速檢測 *P. ramorum* 的存在情形。

關鍵詞：櫟樹猝死病、聚合酶連鎖反應、快速檢測、疫病菌

緒 言

Phytophthora ramorum 第一次被記錄是在 1993 年，當時荷蘭與德國都發生嚴重的杜鵑枝枯病 (twig blight)，自病組織所分離的病原菌之型態雖與 *P. palmivora* (Bulter) Bulter 有些相似，但很難明確鑑別其分類地位；接種試驗發現，這些菌株對於杜鵑 (*Rhododendron* spp.) 枝條具有非常強的致病性[24]。至 1998 年，類似菌株又陸續在罹病杜鵑及珊瑚樹 (莢迷) (*Viburnum* sp.)被發現，進一步進行型態鑑定與核酸序列分析的結果顯示其為新種，故被正式定名為 *Phytophthora ramorum* Werres, de Cock & Man in't Veld, sp. Nov.[25]。

除了杜鵑及珊瑚樹外，*P. ramorum* 也會感染其他植物。此病原菌在美國加州沿海森林造成危害最早可回溯至 1995 年，但直到 2000 年秋天，內華達山脈的楓樹也遭到侵襲後，惟恐其潛藏的嚴重破壞性可能毀滅北美洲的森林

地，*P. ramorum* 始受到高度重視[17, 18]。除了荷蘭、德國及美國外，在歐洲許多國家也都可發現 *P. ramorum*，但尚未在我國出現。該菌爲害的作物甚多，依據美國 the Systematic Mycology and Microbiology Laboratory (SMML), Agricultural Research Service 的記錄，目前的寄主植物多達 94 種，分布於 17 科 26 屬 (http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/index.cfm)，且數目仍在增加中。按照病徵的特性，*P. ramorum* 引發的病害可大致區分爲兩類：ramorum 枯萎病 (ramorum blight)與櫟樹猝死病 (sudden oak death; SOD)[4, 6]；前者特指 *P. ramorum* 在杜鵑、珊瑚樹等木本觀賞植物及其他林木所引起的病害，造成之病徵主要包括葉枯、枝枯及梢枯；後者爲 *P. ramorum* 在石櫟 (*Lithocarpus densiflorus*; tanoak), Coast live oak (*Quercus agrifolia*), California black oak (*Q. kelloggii*)及 Shreve oak (*Q. parvula var. shrevei*) 等樹種所引起的病害，造成的病徵主要是在莖幹引起潰瘍，終至樹勢衰退、樹木死亡。以石櫟爲例，其被 *P. ramorum* 感染時，首先出現的病徵爲新芽萎凋，之後葉片顏色逐漸轉淡；二至三星期後，葉片褐化凋落即預告了樹木死亡的命運。*Q. agrifolia* 及 *Q. kelloggii* 被感染時，先是樹幹部分外泌深酒紅色的流膠，之後流膠處下方出現潰瘍[5, 17]。由於病原性強，且寄主多爲重要林木及灌木，若不幸入侵，將嚴重影響生態、景觀與種苗產業，因此 *P. ramorum* 已被包括我國在內的許多國家列爲重要檢疫病原菌。

一般進行疫病診斷時，得先自罹病組織分離菌株，不僅費事，所需時間也相當長，進行顯微鏡觀察時還須具備相當之專業知識與實務經驗，更增加困難度。有鑒於此，目前針對各種疫病菌所開發的快速檢測技術種類繁多，所使用的技術涵括聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction; PCR), nested PCR 及瞬間即時監控定量 PCR (real-time quantitative PCR)等[9, 10, 15, 22]。由於 *P. ramorum* 的重要性，近年來針對此病原菌所開發的技術更是推陳出新，其中包括了 loop-mediated isothermal amplification (LAMP)、應用抗體開發之 lateral flow device (LFD)，及應用 TaqMan chemistry 與 molecular beacon 進行定量 PCR 等[2, 8, 20, 21]，爲 *P. ramorum* 的檢測與鑑定增添許多新利器。本研究之目的在以 PCR 開發 *P. ramorum* 快速檢測技術，並設立標準檢驗流程以提供檢疫單位使用。

材料與方法

菌株收集與培養

本研究分析之菌株共 51 株，分屬於 34 種 (表一)，其中 *P. kernoviae* Brasier, Beales & S. A. Kirk, *P. lateralis* (Tucker & Milbrath), *P. nemorosa* E. M. Hansen and Reeser, *P. pseudosyringae* T. Jung & Delatour, *P. ramorum* 與 *P. rubi* (W.F. Wilcox & J.M. Duncan) Man in 't Veld 2007 之菌株，分別依循農業委員會動物植物防疫檢疫局之規定自國外引進；真菌菌株主要由臺灣大學曾顯雄教授提供。

Phytophthora spp., *Pythium* spp. 及 *Peronophythora litchii* 等卵菌以 10% V8-蔬菜汁瓊脂培養基(10% VA) (10% Campbell’s V8 juice, 0.02% $CaCO_3$, 1% Select agar)培養，其中 *P. infestans* (Montagne) de Bary, *P. kernoviae*, *P. lateralis*, *P. nemorosa*, *P. pseudosyringae* 與 *P. ramorum* 培養於 19^oC，其餘菌株培養於 25^oC；真菌供試菌株以馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (potato dextrose agar, PDA; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) 培養於 28^oC。

自疫病菌及其他供試菌株製備核酸

欲製備核酸時，供試菌株以10% V8-蔬菜汁培養基(10% Campbell’s V8 juice, 0.02% $CaCO_3$) 或馬鈴薯葡萄糖培養液(potato dextrose broth, PDB; Difco Laboratories) 定溫培養後，收集菌絲，以蒸餾水沖洗數次，並以冷凍乾燥機抽乾。之後，將乾燥菌絲放入研缽中加液態氮研磨，再參照廠商所提供之流程以 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Basel, Switzerland) 純化 DNA。

疫病菌專一性核酸引子對之設計

我們自GenBank (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 與 Phytophthora database (http://www.phytophthoradb.org/index.php) 收集疫病菌的核酸序列，以Clustal X進行多序列併列分析，並根據核醣體RNA基因保守性較高的區域設計疫病菌屬專一性引子對Phy-2S與Phy-7A，及根據YPT基因(其產物爲 Ras-like protein) 序列變異程度較大之區域設計*P. ramorum*種專一性核酸引子對ramyptF1與ramyptR1，其中ramyptF1引子爲根據Yram4F引子[20]略

加修改而成 (表二)；此外，也自GenBank收集及分析杜鵑的核醣體RNA基因序列，以設計杜鵑引子對 (表二)。

核酸引子對專一性及靈敏度測試

核酸引子對之專一性以PCR進行測試，反應物包含10 ng 病原菌DNA, 1.0 µM核酸引子對、0.2 mM dNTP, 1X PCR緩衝液(10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100) 及1 單位DyNazyme^{TM} II DNA polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland)，所使用的儀器爲GeneAmp PCR system 9700 (Perkin elmer, Foster City, CA, USA)，PCR的反應條件爲：(1) 94^{o}C, 5分鐘；(2) [94^{o}C/30秒- 60^{o}C/30秒- 72^{o}C/30秒]共30個循環；(3) 72^{o}C/7分鐘。進行核酸引子對靈敏度測試時，將*P. ramorum*之核酸系列稀釋後依前述反應條件分別進行PCR；增殖所得之PCR產物以瓊脂凝膠進行電泳分析，膠體經溴化乙錠 (ethidium bromide) 染色後，置於紫外燈觀察箱檢視，並拍照紀錄分析結果。

表一、本研究分析之菌株

Table 1. *Phytophthora* spp. and other isolates analyzed in this study

Species	Isolate	Location	Host
Phytophthora botryosa	ATCC26479		
P. capsici	p21170	Yunlin	*Capsicum annuum* (sweet pepper)
P. cinnamomi	PC97	Hawaii	
	p94006	Wufeng, Taichung	*Persea Americana* (avocado)
P. citricola	p9024	Linluo, Pingtung	*Syzygium samarangese* (wax apple)
	P9025	Sinyuan, Pingtung	*S. samarangese* (wax apple)
P. citrophthora	p95004	Ilan	*Fortunella* sp. (kumquant)
P. colocasiae	p9177	Minsyong, Chiayi	*Colocasie esculenta* (taro)
	p97066	Shueili, Nantow	*C. esculenta* (taro)
P. cryptogea	p94011	Yongjing, Changhua	*Gerbera jamesonii* (Transvaal daisy)
P. infestans	p28184	Sinyi, Nanto	*Solanum lycopersicum* (tomato)
	p28187	Sinyi, Nanto	*S. lycopersicum* (tomato)
P. kernoviae	P1571 [a]		
	P1608[a]		
P. lateralis	366[b]		
	368[b]		
	T4P3[b]		
P. meadii	NTU-01	Taipei	*Zantedeschia aethiopica* (white arum lily)
P. melonis	p96032	Tainan	*Benincasa hispida* (wax gourd)
	p98106	Tainan	*Momordica charantia* (bitter gourd)
	p98141	Pusin, Changhua	*Cucumis sativus* (cucumber)
P. nemorosa	2977[c]		*Umbellularia californica*
	3101[c]		*U. californica*
P. palmivora	PPaA1-5	Madou, Tainan	*Persea Americana* (avocado)
	p9253	Taitung	*Phalaenopsis* sp.

表一、本研究分析之菌株 (續)

Table 1. *Phytophthora* spp. and other isolates analyzed in this study (Cont.)

Species	Isolate	Location	Host
P. parasitica	p98151	Wufeng, Taichung	*Pandanus amaryllifolius*
	P98161	Wufeng, Taichung	*Adenium obesum* (desert rose)
P. pseudosyringae	4340[b]		
P. ramorum	2698[c]		*Lithocarpus densiflorus*
	2702[c]		*Heteromeles arbutifolia*
	2767[c]		*Sequoia sempervirens*
	PD98/5233[d]		*Rhododendron* sp.
	PD98/6743[d]		*Viburnum* sp.
	PD20019539[d]		*Rhododendron* sp.
P. rubi	99F02[e]		
Peronophythora litchii	p90113	Minsyong, Chiayi	*Litchi chinensis* (litchi)
Pythium aphanidermatum	pya1	Taipei	*Solanum lycopersicum* (tomato)
Py. myriotylum	pym1	Taipei	*Zingiber officinale* (ginger)
Py. irregulare	pyi1	Chu-Shan, Nanto	Pinus taiwanensis (Taiwan red pine)
Py. oligandrum	pyo1	Taipei	(soil)
Py. splendens	pys10	Puli, Nanto	
Py. sylvaticum	CCRC33460		
Py. ultimum	pyu1		
Colletotrichum gloeosporioides	YAC005	Gukeng, Yunlin	*Citrus reticulate* (mandarin)
Ganoderma australe	R2019 GA10	Puli, Nanto	*Annona Squamosa* (sugar apple)
G. lucidium	R2480 GL7	Taichung	*Delonix regia* (flame tree)
Lasiodiplodia theobromae	F29006	Guoshing, Nanto	*Peperomia obtusifoliam* (betel pepper)
Phellinus noxius	PNA3-1	Donghe, Taitung	*Annona Squamosa* (sugar apple)
Penicillin spp.		Gukeng, Yunlin	*Citrus sinensis* (orange)
Rosellinia necatrix	R9864 RN8-2		*Ardisia crenata* (coral ardisia)
Rhizoctonia solani	507		

[a] provided by Dr. Clive Brasier (Forest Research Agency, UK).

[b] provided by Dr. Everett M. Hansen (Department of Botany and Plant Pathology, Oregon State University, USA).

[c] provided by Dr. David Rizzo (Department of Plant Pathology, University of California, Davis, USA).

[d] provided by Dr. Hans de Gruyter (Plant Protection Service, Section Mycology, the Netherlands).

[e] provided by Dr. Willem A. Man in’t Veld (Plant Proection Service, the Netherlands).

以杜鵑葉片誘釣疫病菌

爲建立 *P. ramorum* 誘釣流程，將 *P. ramorum* (菌株編號 9539) 繼代培養於 10% VA，並於 19^{o}C 定溫培養 10 天後，自帶菌培養基切取 1.0 × 1.0 cm 之菌絲塊 10 片，並移置於含 20 mL 無菌水的培養皿 (直徑爲 9 cm)。另取艷紫杜鵑 (*Rhododendron pulchrum* Sweet)新葉以 1%次氯酸鈉表面消毒 1 分鐘後，用無菌水漂洗，並切成 0.6 cm^2 之片段。將這些杜鵑葉片段置入前述培養皿(每皿 6-8 片)後，依實驗需要置於 15^{o}C 定溫箱 (12 h 光照-12 h 黑暗) 一

表二、本研究所使用之核酸引子及其序列

Table 2. Oligonucleotide primers used in this study and their sequences

Name	**Sequence (5’ to 3’)**	**Target gene**	**Expected size of the PCR product (bp)**
Phy-2S	GGG TGA TAC TCC CGT TCA TC	28S rDNA of *Phytophthora* spp.	527
Phy-7A	GCA TAG CAA GCT ATC CGC ACA		
ramyptF1	TGT CAG TGA CCT CTC TCT CTC T	YPT of *P. ramorum*	189
ramyptR1	GGA AAC TCA CCC ACG GAA AGT G		
rdhITSF1	GTT CAC GTC CCC TGC CCG TTT C	ITS1-5.8S rDNA of *Rhododendron* spp.	245
rdhITSR1	ACG GGG TGA GTG GAT GAC GCA		

定時間。之後，取出杜鵑葉片置於研缽中以液態氮磨碎，並用 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) 抽取 DNA，以便進行 PCR，但此時之 PCR 反應物除了 *P. ramorum* 專一性引子對外，還另外加入疫病菌引子對 (1.0 µM; Table 2) 及杜鵑引子對 (1.0 µM; Table 2)，以做爲對照。

結　果

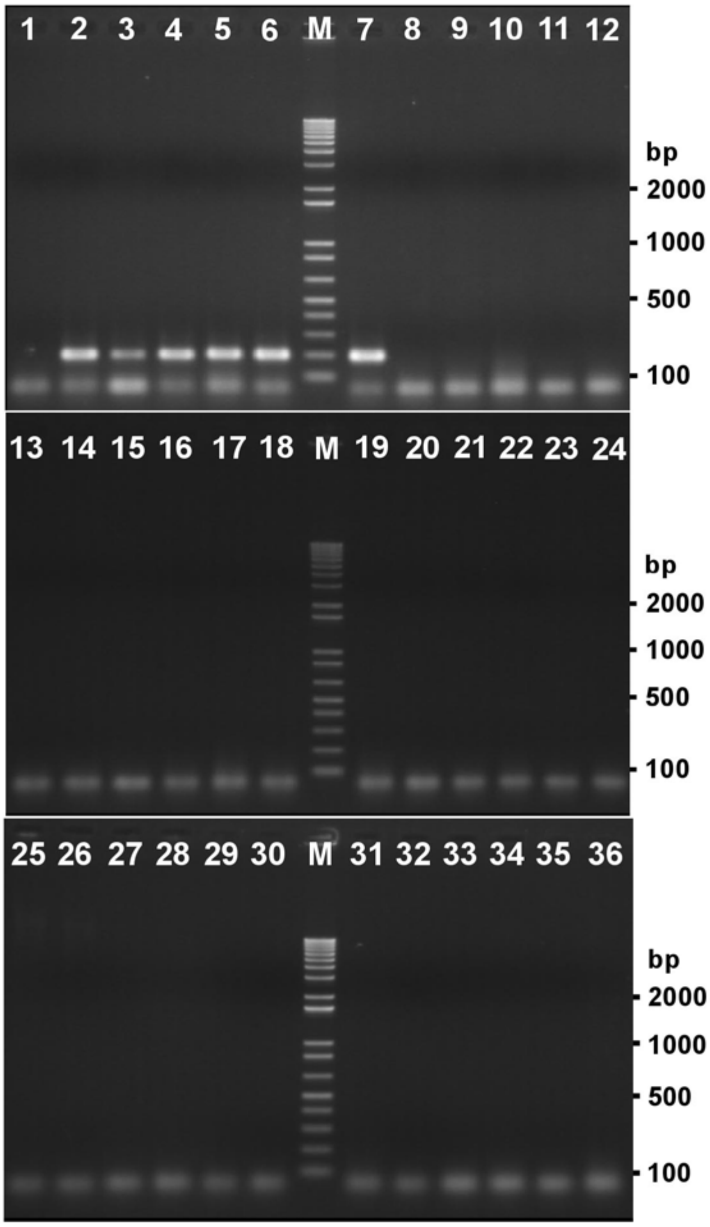
專一性核酸引子對之設計、測試及靈敏度

爲設計 *P. ramorum* 專一性引子對，我們自 GenBank 及 Phytophthora database 搜尋及下載多種疫病菌基因的核酸序列，併列分析整理後發現 YPT 基因之核酸序列在不同疫病菌種類的歧異度甚高，頗適合於設計種專一性核酸引子對；根據 YPT 核酸序列所設計的 *P. ramorum* 引子定名爲 ramyptF1 與 ramyptR1 (表二)。爲測試這一對引子的專一性，我們分別以表一所列供試菌株的核酸爲模版進行 PCR，這些菌株包括不同種類之疫病菌 (*Phytophthora* spp.)、腐霉菌 (*Pythium* spp.)、荔枝露疫病菌 (*Peronophythora litchii* Chen ex Ko et al.) 及多種真菌。進一步以瓊脂膠體電泳技術分析 PCR 擴增產物時，發現以 ramyptF1 + ramyptR1 爲引子對進行 PCR 時，惟有在以 *P. ramorum* DNA 爲模版時才能擴增得符合預期長度 (189 bp) 的核酸片段，而且自所有供試之 *P. ramorum* 菌株都可成功獲得擴增產物 (圖一)，但以其他卵菌及真菌菌株之 DNA 進行反應時，都無法獲得任何擴增片段。進一步以系列稀釋的 *P. ramorum* DNA (菌株編號 9539) 進行靈敏度分析發現，以 ramyptF1 + ramyptR1 進行 PCR 時，至少須加入 1 ng DNA 爲模版才可獲得明顯的擴增產物 (圖二)。

此外，我們也根據 28S rDNA 的核酸序列設計可同時檢測多種疫病菌的引子對；專一性測試結果顯示，以引子對 Phy2S + Phy7A (表二) 進行反應時，可自不同種類之 *Phytopthora* 的 DNA 擴增出符合預期長度 (527 bp) 的核酸片段，但以 *Pythium* spp.及其他供試菌株之 DNA 爲模版時無法獲得任何擴增產物，惟一的例外是引起荔枝露疫病的 *Pe. litchii* (圖三)；爲分析其檢測靈敏度，我們將 *P. ramorum* (菌株編號 9539) DNA 系列稀釋後進行 PCR。實驗結果發現，以 Phy2S + Phy7A 進行 PCR 時，至少需 10 pg 之 *P. ramorum* DNA 才可獲得顯著的擴增產物 (圖四)。

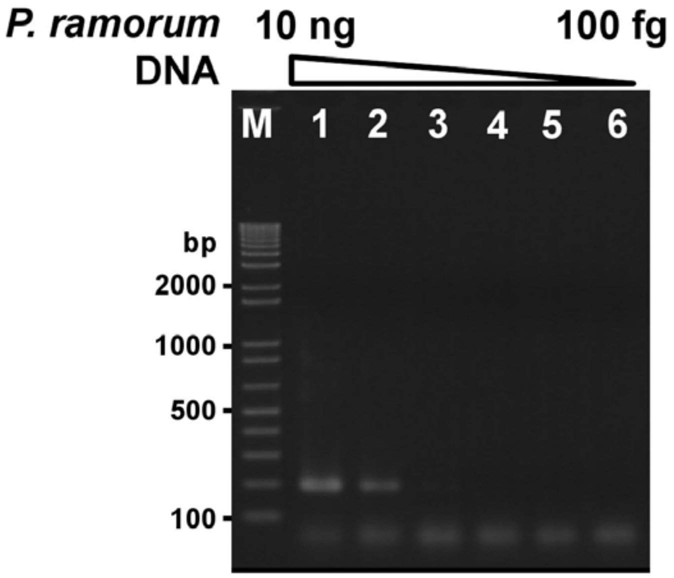
應用專一性引子對測試罹病組織

實地檢測 *P. ramorum* 時，受檢樣品可能包括植物組織及栽培介質；樣品爲植物軟組織時，可直接自植物抽取 DNA 以進行 PCR，針對受檢樣品爲原木或栽培介質之情況，我們另外設計以杜鵑葉片誘釣 *P. ramorum* 的試驗。將 *P. ramorum* 菌絲塊與杜鵑葉片同時放入無菌水靜置一段時間後，即可取出杜鵑葉片進行鏡檢，若有需要可再進一步抽取 DNA 以進行 PCR。



圖一、*Phytophthora ramorum* 引子對ramyptF1與ramyptR1之專一性測試。

Fig. 1. Specificity test of *Phytophthora ramorum* primers ramyptF1 and ramyptR1. PCR was performed using DNA from different isolates as the template, and ramyptF1 + ramyptR1 as the primers. The amplified products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. Results from representative isolates were shown in the figure, including: *P. pseudosyringae* 4340 (lane 1), *P. ramorum* 2698 (2), *P. ramorum* 2702 (3), *P. ramorum* 2767 (4), *P. ramorum* 5233 (5), *P. ramorum* 6743 (6), *P. ramorum* 9539 (7), *Peronophythora litchi* p90113 (8), *Pythium aphanidermatum* pya1 (9), *Py. myriotylum* pym1 (10), *Py. irregular* pyi1 (11), *Py. oligandrum* pyo1 (12), *P. botryosa* ATCC26479 (13), *P. capsici* p21170 (14), *P. cinnamomi* PC97 (15), *P. cinnamomi* p94006 (16), *P. citricola* p9024 (17), *P. citrophthora* p95004 (18), *P. colocasiae* p9177 (19), *P. colocasiae* p97066 (20), *P. cryptogea* p94011 (21), *P. melonis* p98106 (22), *P. melonis* p98141 (23), *P. melonis* p96032 (24), *P. infestans* p28184 (25), *P. infestans* p28187 (26), *P. kernoviae* P1571 (27), *P. kernoviae* P1608 (28), *P. lateralis* 366 (29), *P. lateralis* 368 (30), *P. lateralis* T4P3 (31), *P. meadii* NTU-01 (32), *P. nemorosa* 2977 (33), *P. nemorosa* 3101 (34), *P. palmivora* PpaA1-5 (35), and *P. parasitica* p98151 (36). M: 1 kb ladder (Invitrogen) as the size marker.



圖二、*Phytophthora ramorum* 引子對ramyptF1與ramyptR1之靈敏度測試。

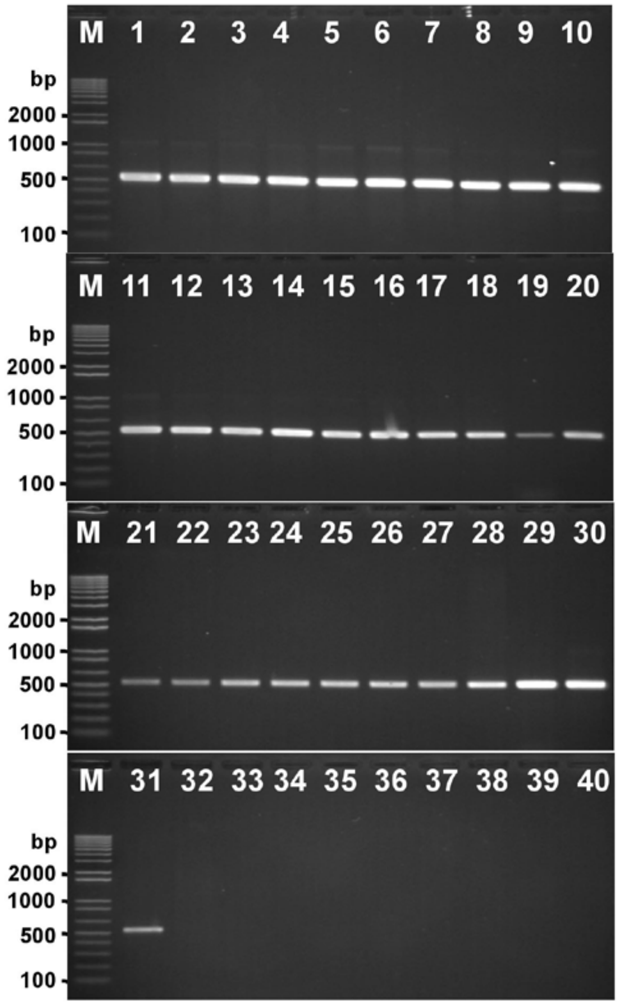
Fig. 2. Sensitivity test of *Phytophthora ramorum* primers ramyptF1 and ramyptR1. PCR was performed using serial dilutions of DNA from *P. ramorum* as the template, and ramyptF1 + ramyptR1 as the primers. The amplified products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. The amount of template DNA used in each reaction was: (1) 10 ng, (2) 1 ng, (3) 100 pg, (4) 10 pg, (5) 1 pg, and (6) 100 fg, respectively. M: 1 kb ladder (Invitrogen) as the size marker.

以抽取自豔紫杜鵑葉片釣餌之 DNA 進行 PCR 時，除了 *P. ramorum* 專一性引子對(ramyptF1 + ramyptR1) 外，我們另外添加疫病菌引子對 (Phy2S + Phy7A) 及針對杜鵑 ITS 所設計之引子對 (RdhITSF1 + RdhITSR1)。以電泳分析擴增產物時發現，若以健康葉片之 DNA 爲模版，僅獲得一個長度爲 245 bp 的核酸片段，其爲以引子對 RdhITSF1 + RdhITSR1 所獲得的擴增產物 (圖五- 1)；單以 *P. ramorum* DNA 爲模版時，出現二個核酸片段，長度分別爲 527 bp 與 189 bp，其分別代表以 Phy2S + Phy7A 及 ramyptF1 + ramyptR1 爲引子對所獲得的擴增產物 (圖五- 2)；相對的，以杜鵑葉片誘釣病原菌，並於不同時間收取葉片 DNA 進行擴增反應時，自第 12 小時及第 1 天所收之樣品僅出現長度爲 245 bp 的擴增產物 (圖五- 3 及 4)；在第 2 天所收集之葉片 DNA 可擴增得長度分別爲 527 及 245 bp 之核酸片段 (圖五- 5)，其分別代表 Phy2S + Phy7A 及 RdhITSF1 + RdhITSR1 的擴增產物；之後，於第 3、5 及 7 天所收集之葉片 DNA 都可擴增得長度分別爲 527, 245 及 189 bp 之核酸片段樣品，顯示此樣品含有 *P. ramorum* (圖五- 6, 7, 8)。另一方面，進行模擬誘釣試驗時，若以 *P. citrophthora* (Smith & Smith) Leonian 取代 *P. ramorum*，再依前述方式進行分析時，第 12 小時及第 1 天所收集之樣品僅出現長度爲 245 bp 的擴增產物 (圖五- 9 及 10)，但自第 2 天起所收集之 DNA 都可擴增得長度分別爲 527 及 245 bp 之核酸片段 (圖五- 11, 12, 13, 14)，顯示此樣品含有 *Phytophthora* sp., 但顯然不是 *P. ramorum*。

討　論

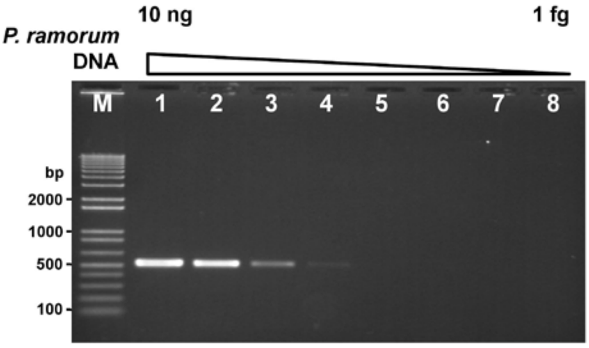
近幾年來，在國際間，由於櫟樹猝死病危害嚴重，其病原菌 *P. ramorum* 受到極大的重視，相關研究的進展也甚爲快速，爲吾人認識此病原菌提供許多新知[6, 7]。爲有效遏阻其傳播，不論美國或英國的政府單位都已針對 *P. ramorum* 開發快速檢測技術及設立標準檢測流程，以便應用於大規模篩檢與病害監測[1, 15]；除此之外，LAMP, LFD 及 TaqMan chemistry 等技術也陸續被運用於開發 *P. ramorum* 快速檢測技術[8, 11, 13, 21]。儘管目前可應用之檢測方法極爲多元，但這些方法各有其優劣點[14]；因 PCR 具有操作簡便、成本及技術門檻都相對較低等優點，本研究選擇以 PCR 開發 *P. ramorum* 快速檢測技術。一般設計疫病菌專一性引子對時，常以核醣體 internal transcribed spacer 1 (ITS1), ITS2 及粒線體 cytochrome oxidase (COX) 基因之序列爲標的[14]，但由於 *P. ramorum* 與其近緣種 *P. lateralis* 的 ITS 序列幾近相同，很難以 ITS 設計專一性引子對[25]；此外，COX 序列富含 A (adenosine)與 T (thymidine)，也較難設計合適的引子對，故本研究採用 YPT 基因，其亦曾被用於開發 *P. cinnamomi* Rands, *P. cryptogea* Pethydrige & Lafferty 及 *P. ramorum* 等之快速檢測技術[16, 19, 20]。分析結果顯示，本研究根據 YPT 基因所設計的引子對具備良好專一性，且自所測試的 6 株 *P. ramorum* 都可擴增出預期的核酸片段 (圖一)；不過，因爲疫病菌 YPT 基因之數量遠低於核醣體 RNA 基因，其呈現的檢測靈敏度也較核醣體 RNA 基因遜色[15,22]。此外，

本研究根據核醣體 RNA 基因序列所設計的引子對 Phy2S 與 Phy7A 可用於檢測不同種類之疫病菌；然而以 *Pe. litchii* DNA 為模板進行 PCR 時，這對引子也可獲得擴增產物，這可能是因為此菌與疫病菌類緣關係相近所致，但因 *Pe. litchii* 主要感染荔枝，寄主範圍明確，尚不至於影響 Phy2S 與 Phy7A 的應用性。



圖三、疫病菌引子對Phy2S與Phy7A之專一性測試。

Figure 3. Specificity test of *Phytophthora*-specific primers Phy2S and Phy7A. PCR was performed using DNA from different isolates (Table 1) as the template, and Phy2S + Phy7A as the primers. The amplified products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. Results from representative isolates were shown in the figure, including: *P. botryosa* ATCC26479 (lane 1), *P. capsici* p21170 (2), *P. cinnamomi* p94006 (3), *P. cinnamomi* PC97 (4), *P. citricola* p9024 (5), *P. citricola* p9025 (6), *P. citrophthora* p95004 (7), *P. colocasiae* p9177 (8), *P. colocasiae* p97066 (9), *P. cryptogea* p94011 (10), *P. melonis* p98106 (11), *P. melonis* p96032 (12), *P. melonis* p98141 (13), *P. meadii* NTU-01 (14), *P. infestans* p28184 (15), *P. rubi* 99F02 (16), *P. palmivora* p9253 (17), *P. palmivora* PpaA1-5 (18), *P. parasitica* p98151 (19), *P. parasitica* 98161 (20), *P. ramorum* 9539 (21), *P. ramorum* 5233 (22), *P. ramorum* 2767 (23), *P. ramorum* 2698 (24), *P. nemorosa* 2977 (25), *P. nemorosa* 3101 (26), *P. lateralis* 366 (27), *P. lateralis* 368 (28), *P. pseudosyringae* 4340 (29), *P. kernoviae* P1571 (30), *Peronophythora litchii* p90113 (31), *Py. aphanidermatum* pya1 (32), *Py. myriotylum* pym1 (33), *Py. irregulare* pyi1 (34), *Py. oligandrum* pyo1 (35), *Py. splendens* pys10 (36), *Py. sylvaticum* CCRC33460 (37), *Py. ultimum* pyu1 (38), *Colletotrichum gloeosporioides* YAC005 (39), and *Penicilllium* sp. (40). M: 1 kb ladder (Invitrogen) used as the size marker.

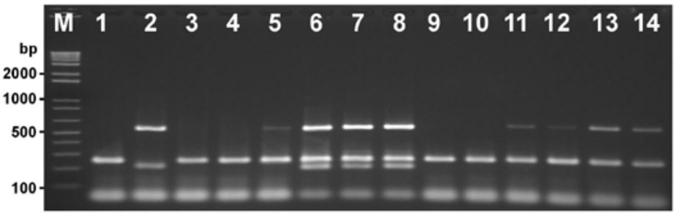


圖四、疫病菌引子對Phy2S與Phy7A之靈敏度測試。

Fig. 4. Sensitivity test of *Phytophthora*–specific primers Phy2S and Phy7A. PCR was performed using serial dilutions of DNA from *P. ramorum* as the template, and Phy2S and Phy7A as the primers. The amplified products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis. The amount of template DNA used in each reaction was: (1) 10 ng, (2) 1 ng, (3) 100 pg, (4) 10 pg, (5) 1 pg, (6) 100 fg, (7) 10 fg, and (8) 1 fg, respectively. M: 1 kb ladder (Invitrogen) as the size marker.

針對檢測樣本可能是栽培介質或其他不易抽取核酸之材料的問題，我們以杜鵑葉片爲釣餌建立先誘釣再進行PCR之檢測流程，也藉此建立自植物抽取核酸及進行PCR分析的標準流程。杜鵑亦爲 *P. ramorum* 之寄主，但以金毛杜鵑 (*R. oldhamii* Maxim)、白花杜鵑(*R. mucronatum* (Blume) G. Don)及豔紫杜鵑分別進行誘釣試驗後，發現豔紫杜鵑對於*P. ramorum*的誘釣效果最好(data not shown)，故我們特別選用此種杜鵑。自杜鵑抽取 DNA 時，原擬採用簡便的 NaOH 核酸粗抽法[22, 23]，但浸在 NaOH 溶液之杜鵑葉片一經磨碎，即刻發生褐變現象，無法獲得品質穩定之核酸，故本研究採用商品化之核酸純化試劑抽取杜鵑DNA。此外，爲了能明確判別 PCR 檢測結果，我們應用multiplex PCR 的概念，在 PCR 反應物加入三對引子，其可分別針對杜鵑、疫病菌屬及 *P. ramorum* 之核酸進行擴增反應。如此，若擴增產物僅爲單一、長度爲 245 bp 之核酸片段，代表檢測樣品不含疫病菌，藉此也可避免 DNA品質不佳或 PCR 擴增反應出狀況時可能導致之結果誤判的問題。若擴增產物僅有二個核酸片段(長度各爲 245 與527 bp)，代表檢測樣品含有疫病菌，但並非 *P. ramorum*；若擴增產物爲三個核酸片段，代表檢測樣品含有 *P. ramorum*，應小心處理，但也應注意其他疫病菌存在的可能性。

過去十多年來，疫病菌種類由原本近 60 種大幅增加至目前估計至少有 117 種[12]，新被發現的重要菌種除了*P. ramorum*外，*P. kernoviae*也是廣受矚目的重要病原菌，其寄主包括山毛櫸 (*Fagus sylvatica*)、櫟樹 (*Quercus robur*) 及杜鵑等，在杜鵑引起之病徵爲芽枯、葉部壞疽及萎凋[3]；因其潛在的威脅性，目前 *P. kernoviae* 已被歐洲及地中海地區植物保護組織 (EPPO; Europen and Mediterranean Plant Protection Organization) 列入警戒名單 (Alert List)，也值得我們密切注意。由於 *P. ramorum* 與 *P. kernoviae* 等疫病菌均不存在我國，如果入侵將對我國許多高山植物造成嚴重傷害，因此本研究特地建立高靈敏度之快速偵測技術，可以正確檢測 *P. ramorum*。此外，該技術亦有助於檢測其他疫病菌，不管自檢疫或防疫的觀點都有助於及早發現病原菌的存在情形，可提供相關單位使用。



圖五、以multiplex PCR檢測杜鵑葉片對*Phytophthora ramorum*之誘釣結果。

Fig. 5. Detection of *Phytophthora ramorum* by PCR following baiting with the leaves of *Rhododendron pulchrum*. Following baiting of *P. ramorum* for indicated periods of time, *R. pulchrum* leaves were collected for isolation of DNA, followed by a multiplex PCR with three sets of primers: Phy2S + Phy7A, ramyptF1 + ramyptR1, and rdhITSF1 + rdhITSR1 (lanes 3-8). A parallel set of experiments was performed with *P. citrophthora* as the baited pathogen (lanes 9-14). Lanes 3 and 9: 12 h, 4 and 10: 1 day, 5 and 11: 2 days, 6 and 12: 3 days, 7 and 13: 5 days, 8 and 14: 7 days. DNA from healthy leaves of *R. pulchrum* (lane 1) and *P. ramorum* (lane 2) was used as a control. The PCR products were analyzed by 2.5% agarose gel electrophoresis. M: 1 kb ladder (Invitrogen) as the size marker.

致 謝

本研究承農委會動物植物防疫檢疫局計畫支持，特致謝忱；此外也感謝 Dr. David Rizzo, Dr. Hans de Gruyter, Dr. Everett M. Hansen, Dr. Clive Brasier 及曾顯雄教授提供菌株。

引用文獻（LITERATURE CITED）

1. Anonymous, 2006. EPPO diagnostic protocol for regulated pests : *Phytophthora ramorum*. EPPO Bull. 36 : 145-155.
2. Bilodeau, G. J., Lévesque, C. A., de Cock, A. W., Duchaine, C., Brière, S., Uribe, P., Martin, F. N., and Hamelin, R. C. 2007. Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR Green, and molecular beacons. Phytopathology 97: 632-642.
3. Brasier, C. M., Beales, P. A., Kirk, S. A., Denman, S., and Rose, J. 2005. *Phytophthora kernoviae* sp. nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in the UK. Mycol. Res. 109: 853-859.
4. Brasier, C. M., Denman, S., Brown, A., and Webber, J. F. 2004. Sudden oak death (*Phytophthora ramorum*) discovered on trees in Europe. Mycol. Res. 108: 1107-1110.
5. Garbelotto, M., Svihra, P., and Rizzo, D. M. 2001. Sudden oak death syndrome fells three oak species. Calif. Agric. 55: 9-19.
6. Grünwald, N. J., Goss, E. M., and Press, C. M. 2008. *Phytophthora ramorum*: a pathogen with a remarkably wide host range causing sudden oak death on oaks and ramorum blight on woody ornamentals. Mol. Plant Pathol. 9: 729-740.
7. Grünwald, N. J., Garbelotto, M., Goss, E. M., Heungens, K., Prospero, S. 2012. Emergence of the sudden oak death pathogen *Phytophthora ramorum*. Trends Microbiol. 20: 131-138.
8. Hayden, K. J., Ivors, K., Wilkinson, C., and Garbelotto, M. 2006. TaqMan chemistry for *Phytophthora ramorum* detection and quantification, with a comparison of diagnostic methods. Phytopathology 96: 846-854.
9. Hayden, K. J., Rizzo, D., Tse, J., and Garbelotto, M. 2004. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a real-time polymerase chain reaction assay. Phytopathology 94: 1075-1083.
10. Jyan, M. H., Huang, L. C., Ann, P. J., and Liou, R. F. 2002. Rapid detection of *Phytophthora infestans* by PCR. Plant Pathol. Bull. 11: 25-32.
11. Kox, L. F., Brouwershaven, I. R., van de Vossenberg, B. T. L. H., van den Beld, H. E., Bonants, P. J., Gruyter, J. 2007. Diagnostic values and utility of immunological, morphological, and molecular methods for *in planta* detection of *Phytophthora ramorum*. Phytopathology 97: 1119-1129.
12. Kroon, L. P., Brouwer, H., de Cock, A. W., and Govers, F. 2012. The Genus *Phytophthora* anno 2012. Phytopathology 102: 348-364.
13. Lane, C. R., Hobden, E., Walker, L., Barton, V. C., Inman, A. J., Hughes, K. J. D. et al. 2007. Evaluation of a rapid diagnostic field test kit for identification of *Phytophthora* species including *P. ramorum* and *P. kernoviae* at the point of inspection. Plant Pathol. 56: 828-835.
14. Martin, F. N., Abad, Z. G., Balci, Y., Ivors, K. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: Reviewing our progress, identify our needs. Plant Dis. 96: 1080-1103.
15. Martin, F. N., Tooley, P. W., and Blomquist, C. 2004. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. Plant Dis. 94: 621-631.
16. Minerdi, D., Moretti, M., Li, Y., Gaggero, L., Garibaldi, A., and Gullino, M. L. 2008. Conventional PCR and real time quantitative PCR detection of *Phytophthora*

cryptogea on *Gerbera jamesonii*. Eur. J. Plant Pathol. 122: 227-237.

17. Rizzo, D. M., Garbelotto, M., Davidson, J. M., Slaughter, G. W., and Koike, S. T. 2002. *Phytophthora ramorum* as the cause of extensive mortality of *Quercus* spp. and *Lithocarpus densiflorus* in California. Plant Dis. 86:205-214.
18. Rizzo, D. M., Garbelotto, M., and Hansen, E. M. 2005. *Phytophthora ramorum*: Integrative research and management of an emerging pathogen in California and Oregon forest. Annu. Rev. Phytopath. 43: 309-335.
19. Schena, L., and Cooke, D. E. 2008. Development and application of a PCR-based “molecular tool box” for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. Plant Pathol. 57: 64-75.
20. Schena, L., Hughes, K. J., and Cooke, D. E. 2006. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum*, *P. kernoviae*, *P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR. Mol. Plant Pathol. 7: 365-379.
21. Tomlinson, J. A., Dickinson, M. J., and Boonham, N. 2010. Rapid detection of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* by two-minute DNA extraction followed by isothermal amplification and amplicon detection by generic lateral flow device. Phytopathology 100: 143-149.
22. Tsai, H. L., Huang, L. C., Ann, P. J., and Liou, R. F. 2006. Detection of Orchid *Phytophthora* Disease by Nested PCR. Botanical Studies 47: 379-387.
23. Wang, H., Qi, M., and Cutler, A. J. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucl. Acids Res. 21: 4153-4154.
24. Werres, S. and Marwitz, R. 1997. Triebsterben an rhododendron: Unbekannte *Phytophthora*. Deutscher Gartenbau 21: 1166-1168.
25. Werres, S., Marwitz, R., Man in 't Veld, W. A., de Cock, A. W. A. M., Bonants, P. J. M., de Weerdt, M., Themann, K., Ilieva, E., and Baayen, R. P. 2001. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on Rhododendron and Viburnum. Mycol. Res. 105: 1155-1165.

Abstract

Peng, Ke-Chun[1], Ann, Pao-Jen[2], Lin, Chu-Ping[1], Chiang, Ti-Wei[1], and Liou, Ruey-Fen[1]. Development of PCR methods for rapid detection of *Phytophthora ramorum*, a quarantine pathogen of Taiwan. [1]Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei, 106, Taiwan; [2]Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung 403, Taiwan. Plant Pathology Bulletin 21: 53-64.

Phytophthora ramorum Werres, De Cock & Man in't Veld, sp. nov., the pathogen of sudden oak death (SOD) and ramorum blight, is known to infect a variety of plants including oaks, *Rhododendrom*, and *Viburnum* species. Currently, infection by *P. ramorum* occurs mainly in Europe and North America. None has been reported in Taiwan. Owing to its threat to woody ornamental plants and the forest ecosystems, *P ramorum* has become an important quarantine pest of Taiwan. In order to develop a technique for rapid detection of this pathogen, we designed three sets of primers, each specific for *P. ramorum* (ramyptF1 + ramyptR1), *Phytophthora* spp. (Phy2S + Phy7A), and *Rhododendron pulchrum* Scoeet (rdhITSF1 + rdhITSR1), respectively. Specificity of the first two sets of primers was verified by PCR. Further analysis indicated that PCR primed with ramyptF1 and ramyptR1 may amplify *P. ramorum* DNA with a low limit of 1 ng, while that for Phy2S and Phy7A was 10 pg. To facilitate detection of *Phytophthora* pathogens which might exist in the imported materials, we established a diagnostic protocol which is comprised of the baiting with the use of leaves of *Rhododendron pulchrum* G. Don, followed by a multiplex PCR, which contains all three sets of the aforementioned primers. This method provides a useful tool for rapid detection of *P. ramorum*, and in addition, may help to uncover the possible existence of other *Phytophthora* spp. as well.

Key words: *Phytophthora*, *Phytophthora ramorum*, polymerase chain reaction, ramorum blight, rapid detection, sudden oak death